

Searching PAJ

<http://www19.jpl.nicpi.go.jp/PA1/result/detail/ma...>Abstract
Cited Document 3

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-068090

(43)Date of publication of application : 26.03.1988

(51)Int.CI. C12P 7/64

// C12N 1/14

(C12P 7/64

C12R 1:645)

(21)Application number : 61-211267 (71)Applicant : LION CORP

(22)Date of filing : 08.09.1986 (72)Inventor : TOTANI EISEI

SUNAZAKI

KAZUHIKO

KUDO TOSHIHIRO

(54) PRODUCTION OF LIPID CONTAINING ARACHIDONIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To raise arachidonic acid content based on dried fungus cell weight and arachidonic acid content in lipid extracted from the fungus cell and to obtain high-purity arachidonic acid in high yield, by cultivating a fungus belonging to the genus *Mortierella* in a solid medium using the whole potato.

CONSTITUTION: A fungus belonging to the genus *Mortierella* is cultivated in a solid medium using the whole potato to produce a fungus cell having lipid containing arachidonic acid. When a bivalent metal (e.g. Ca⁺⁺ or Mg⁺⁺) is added to the solid medium and the fungus is cultivated, preferably the yield of arachidonic acid is improved. Potato, taro, sweet potato, etc., may be cited as the potatoes used as the medium and white potato is especially preferable.

LEGAL STATUS

Searching PAJ

<http://www19.jpl.nicpi.go.jp/PA1/result/detail/ma...>**[Date of request for examination]****[Date of sending the examiner's decision of rejection]****[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]****[Date of final disposal for application]****[Patent number]****[Date of registration]****[Number of appeal against examiner's decision of rejection]****[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]****[Date of extinction of right]**

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

Cited Document 3

④日本国特許庁 (JP)

④特許出願公開

④公開特許公報 (A)

昭63-68090

④Int.Cl.⁴

| | |
|-----------|-------|
| C 12 P | 7/64 |
| // C 12 N | 1/14 |
| (C 12 P | 7/64 |
| C 12 R | 1:645 |

識別記号

序内整理番号

④公開 昭和63年(1988)3月26日

7236-4B
C-6712-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

④発明の名称 アラキドン酸含有脂質の製造方法

④特 願 昭61-211267

④出 願 昭61(1986)9月8日

④発明者 戸 谷 永 生 神奈川県小田原市中町3-1-12 コーポ明和102

④発明者 砂 崎 和 彦 神奈川県中郡二宮町富士見ヶ丘3-17-34号

④発明者 工 藤 俊 博 神奈川県秦野市南ヶ丘2-2-2-306号

④出願人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号

④代理人 弁理士 中 村 稔 外5名

明細書

1. 発明の名称 アラキドン酸含有脂質の製造方法

(1) 2.特許請求の範囲

(1) モルティエレラ属に属する糸状菌を、イモ全体を用いた固体培地で培養することによりアラキドン酸を含む脂質を有する菌体を培地中に生産することを特徴とするアラキドン酸含有脂質の製造方法。

(2) 固体培地に2種の金属を添加して培養することを特徴とする特許請求の範囲第(1)項記載のアラキドン酸含有脂質の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明はアラキドン酸含有脂質の製造方法に関するもので、更に詳細にはモルティエレラ属に属する糸状菌を特定の培地で培養して、アラキドン酸含有量の高い脂質を製造する方法に関するものである。

【従来の技術】

アラキドン酸は、子宮筋収縮・弛緩作用、血管拡張、血圧降下作用等、強力かつ多彩な生理活性を有するプロスタグランдин、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆物質といわれ、近年特に注目されている。アラキドン酸は動物界に広く分布しており、従来、動物副腎腺や肝臓から抽出した脂質から分離されている。しかしこれらの脂質中のアラキドン酸含有量は一般に5%以下であり、乾燥細胞質量当たりの収率は0.2%以下にすぎないこと、原材料の大口入手が困難であることなどから、この抽出法はアラキドン酸の有用な製造法とはいえない。

一方、アラキドン酸生産能を有する種々の微生物

物を培養してアラキドン酸を得る方法が提案されている。たとえば特開昭52-64482号公報、同52-64483号公報、同52-64484号公報には、ペニシリウム属、クラドスボリウム属、ムコール属、ファリウム属、ホルモデンドラム属、アスペルギルス属、またはロードトルラ属に属するアラキドン酸生産能を有する微生物を炭化水素、炭水化物等を栄養源とする培地で培養し、培養物からアラキドン酸を採取する方法が記載されている。しかしこの方法により得られる脂質中のアラキドン酸含有量は7.5%以下であり、乾燥菌体当たりの収率も1%に満たない。

また接合菌類はえかび目の糸状菌であるエントモフトラ属、デラクロイキシア属、コニディオボルス属、フィティウム属およびフィトフトラ属に属する菌にアラキドン酸を生産する菌があり、エントモフトラ属のB.エクシティアリスでは脂質中の全脂肪酸の27.1%、B.イグノビリスでは19.1%、B.サクステリアナでは18.8%をアラキドン酸が占めていると報告されている[D.ティレル

(D.Tyrell)、カナディアン・ジャーナル・オブ・マイクロバイオロジー (Can. J. Microbiol.), Vol. 13 (1967), 755-760)。さらにモルティエレラ、レニスボラがアラキドン酸を生産すること、菌糸の脂質生産量は4.8%、脂質中のアラキドン酸含有量は26.7%であること (B.B.ハスキンス (Haskins) ら、Can. J. Microbiol., Vol. 10 (1964), 187~195)、および、紅藻類ボルフィリディウム・クルエンタムがアラキドン酸を生産すること、その収率は、乾燥細胞重量当たり1%以下であること (T.J.アヘルン (Abern) ら、バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング (Biotechnology and Bioengineering), Vol. XXV, 1057-1070 (1983)) も、報告されている。

一方、サントリー・京都大学は、モルティエレラ・エロンガタを液体培養し、0.5~1.0 g/l 培養液のアラキドン酸 (全脂肪酸中含有率 30.1%) を得たと報告している (日本農芸化学会昭和61年度大会、講演要旨集 P. 502)。さらに広島大学は、コニディオボルス属菌を変形エキス

3

4

・酵母エキス・ポリベプトン・グルコースの培養液中で培養し、0.8 g/l のアラキドン酸 (全脂肪酸中含有率 24.5%) を得たと報告している (日本農芸化学会昭和61年度大会、講演要旨集 P. 502)。

さらに本発明者らは、これまでにモルティエレラ属糸状菌の中にアラキドン酸を高率に含有する脂質を生産する菌株があることを特許出願 (特願昭60-218558) したが、アラキドン酸の生産量に関する検討は行っていなかった。

(2)

〔発明が解決しようとする問題点〕

本発明の目的は、乾燥菌体重量当たりのアラキドン酸含有量、およびこの菌体から抽出される脂質中のアラキドン酸含有量ならびに培地当たりのアラキドン酸含有量が高く、アラキドン酸の分離精製が容易で、高精度のアラキドン酸を高収率で得ることができる方法を提供することである。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明の目的は、モルティエレラ属に属するアラキドン酸生産能を有する糸状菌を特定の培地で

培養することにより達成される。

すなわち、本発明は、モルティエレラ属に属する糸状菌を、イモ全体を用いた固体培地で培養することによりアラキドン酸を含む脂質を有する菌体を培地中に生産することを特徴とするアラキドン酸含有脂質の製造方法である。

本発明に有利に使用されるモルティエレラ (*Mortierella*) 属に属するアラキドン酸生産菌の例としては、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*)、モルティエレラ・バイニエリ (*Mortierella bainieri*)、モルティエレラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*)、モルティエレラ・エクシグア (*Mortierella exigua*)、モルティエレラ・ミヌティッシマ (*Mortierella minutissima*)、モルティエレラ・ヴァーティシラタ (*Mortierella verticillata*)、モルティエレラ・ハイグロフィラ (*Mortierella hygrophila*)、モルティエレラ・ポリセファラ (*Mortierella polyccephala*) およびモルティエレラ・レニスボラ (*Mortierella renispora*) 種に属する菌株があげ

5

6

特開昭63-68090(3)

られる。これらの菌の具体例としては、モルティエレラ・アルビナ (*Mortierella alpina*) IPO 8568, ATCC 16266, ATCC 32221, ATCC 42430
 モルティエレラ・バイニエリ (*Mortierella bainieri*) IPO 8569
 モルティエレラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IPO 8570
 モルティエレラ・エクシグア (*Mortierella exigua*) IPO 8571
 モルティエレラ・ミヌティッシマ (*Mortierella minutissima*) IPO 8573
 モルティエレラ・ヴァーティシラタ (*Mortierella verticillata*) IPO 8575
 モルティエレラ・ハイグロフィラ (*Mortierella hygrophila*) IPO 5941
 モルティエレラ・ポリセファラ (*Mortierella polycephala*) IPO 6935
 等があげられる。これらの菌は大阪市の財團法人菌群研究所 (IFO) 及び米国アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type

Culture Collection, ATCC) の菌株目録に記載されている糸状菌である。

上記の糸状菌の培養はイモ全体を用いた固体培地を用いて行われる。培地に使用するイモ類としては、ジャガイモ、サトイモ、サツマイモ、キャッサバ、タロイモ、キクイモなどがあげられ最適には、ジャガイモが用いられる。イモは剥皮してもよいし、剥皮しなくてもよい。固体培地を調製するには、約1四角に切ったイモに水を0-2倍、好ましくは0-1倍加えて煮、水分と共に充分に粉碎したら、炭水化物を0-20%、好ましくは2-10%添加し、よく混合する。炭水化物としては、例えばグルコース、フラクトース、サッカロース、糖蜜、木材糖化液、デンプン水解物などがあげられる。微量添加成分として、2倍の金属を添加することにより培地当りのアラキドン酸の収率をさらに向上させることができる。このような2倍の金属としては、例えばCa⁺⁺あるいはMg⁺⁺があげられる。Ca⁺⁺の添加量は0.02-2g/kg、好ましくは、0.05-1g/kgがよく、Mg⁺⁺の添

7

加量は0.01-5g/kg、好ましくは、0.02-2g/kgがよい。

培養の初発pHは、4.0-7.0が適当であり、培養温度は、10-33で好ましくは、20-30で2-20日間培養される。

このような好気条件での培養により当該糸状菌は培養され、生産される脂質は、大方、菌体内に含まれるので培養物より菌体を分離し、機械的または物理的に摩擦後、溶剤、超臨界二酸化炭素などにより抽出し、アラキドン酸含有量の高い脂質を得る。

得られた脂質は常法の加水分解、エステル化、またはエステル交換後、アラキドン酸の含有率を評価できる。また、脂質中のアラキドン酸含有量が高いために従来法に比較して飛躍的に容易かつ経済的に溶剤やクロマトグラフィー分画、反応付加分離法等により目的のアラキドン酸あるいはアラキドン酸エステルの精製を行うことができる。アラキドン酸あるいはアラキドン酸エステルの収率は、固体培地当り、最高13.1g/kgに達し、液

8

体培地を用いた場合の約1.3倍の生産性を実現できることとなる。

【発明の効果】

本発明によれば、アラキドン酸含有量の高い脂質を得ることができ、培地当り、従来法の約1.3倍の収率でアラキドン酸を生産することができる。このように培地当りおよび脂質中のアラキドン酸含有量が極めて高いので、アラキドン酸の精製を非常に容易かつ短時間に行うことができ、高純度のアラキドン酸を小規模の培地を用いて大量かつ安価に供給することができる。したがってこれを原料として、種々の薬理活性が利用かつ期待されているプロスタグランдин、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等を従来より安価に合成することができる。

【実施例】

以下実施例により本発明を更に具体的に説明する。

実施例1

皮をむいて1四角に切ったジャガイモ 600g

9

10

を400mlの水中で20分間煮た後、No.32のメッシュを通過させて粥状物を作る。これに60gのグルコースを混合し、オートクレーブにて滅菌する。室温に下る前に粥状物を70枚の直径80mmの培養シャーレに流しこみ、固体培地を調製した。得られた培地のうち30枚には、モルティエレラ・アルビナ（IFO 8568）を、モルティエレラ・アルビナ（ATCC 32221）とモルティエレラ・エロンガタ（IFO 8570）は各20枚ずつ白金耳量培養し、25℃で20日間培養した。IFO 8568とATCC 32221については、各20枚の培地に成長した菌糸を採取した。残りの10枚のIFO 8568とIFO 8570の20枚の培地については培地を菌床の裏からスパチュラを用いて割り取り、菌糸と菌床を一緒に収穫した。菌糸（と菌床）は、直ちに乾燥した後、乳鉢内でクロロホルム/メタノール（2:1 v/v）と共にすりつぶし、引き締めクロロホルム/メタノール（2:1 v/v）で脂質を抽出した。得られた脂質はナトリウムメ

トキサイドを用いてメチルエステル化後、その脂肪酸組成をガスクロマトグラフ分析して、アラキドン酸の含有率を求め、表1の結果を得た。

又、上記と同様に調製した粥状物にCaCl₂・2H₂Oを73.5mg/kg及びMgCl₂・6H₂O、400mg/kgを個々に添加し、充分混合、滅菌して作った固体培地シャーレ各20枚にIFO 8568を植菌し、25℃で20日間培養した。成長した菌糸と菌床を採取後、同様に処理して得た各数値もあわせて表1に示した。

一方、日本製薬社製麦芽寒天培地225gおよび同サブロー寒天培地32.5gを蒸留水500mlに加え、オートクレーブで滅菌後、同シャーレ各々25枚に分注して寒天培地を調製した。モルティエレラ・アルビナ IFO 8568を白金耳量培養し、25℃下20日間培養後、菌糸を採取し、乾燥して同様の処理を行いその結果も比較として示した。

約1cm角に切ったジャガイモ100gに水500mlを加え約20分煮沸後、布で漉して得た浸出

11

液にグルコース30gと蒸留水を加え、500mlとした培養液をL字管に250mlずつ分注滅菌後、モルティエレラ・アルビナ IFO 8568を植菌し、25℃下、20日間振盪培養した。得られた菌体は遠心分離により集菌洗浄後、乾燥し、実施例1と同様の処理を行った。結果を表1に示す。

ジャガイモ培地上に増殖する菌糸の脂質は菌床の脂質よりもアラキドン酸含有率が高いが、菌収量は菌床の方が高かった。アラキドン酸の収率は菌糸だけの場合約5g/kg、（菌糸+菌床）の場合は10g以上/kgとなり、サントリー・京都大学法（液体培養・0.5-1.0g/L）の収率の5-13倍となった。

塩化カルシウムや塩化マグネシウムを培地に加えると菌体重量及びメチルエステル量に伴ってアラキドン酸の収率はそれぞれ27%及び18.4%増加し、Ca⁺⁺やMg⁺⁺の顕著な効果が認められた。

12

13

-680-

特開昭63-68090(5)

卷二

| 菌 | 培地 | 部位 | 乾燥菌体重量 (g/kg) | 乾燥菌体重量 当り のメチルエチデン (%) | 乾燥菌体重量 当り のアラキ ン酸メチル (%) | 乾燥菌体重量 当り のアラキ ン酸 (%) | 本発明 |
|------------|---------------------------------------------------|-------|------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---------|
| 1FO 8568 | ジャガイモ | 菌糸 | 36.5 | 23.2 | 67.4 | 15.6 | 5.7 |
| | 菌糸+胞子 | | 85.8 | 26.6 | 45.1 | 12.0 | 10.3 |
| | CaCl ₂ ・2H ₂ O 755 mg/kg | 菌糸+胞子 | 95.9 | 27.8 | 49.2 | 13.7 | 13.1 |
| | NaCl ₂ ・6H ₂ O 400 mg/kg | 菌糸+胞子 | 100.8 | 25.6 | 47.1 | 12.1 | 12.2 |
| 黄茅茎天 | 菌糸 | 1.08 | 33.7 | 78.8 | 26.6 | 0.281 | 出枝所 |
| | サブローラ・茎天 | 菌糸 | 0.76 | 6.9 | 31.1 | 2.1 | 0.2.0.5 |
| ATCC 32221 | ジャガイモ | 菌糸 | 28.1 | 29.2 | 64.5 | 18.8 | 5.4 |
| 1FO 8570 | ジャガイモ | 菌糸+胞子 | 84.4 | 33.3 | 28.8 | 9.6 | 8.1 |
| 1FO 8568 | ジャガイモ 2000/4浸出液 | 菌体 | 64.8 | 36.5 | 42.3 | 15.4 | 0.993 |